

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号： 14301  
研究種目： 研究活動スタート支援  
研究期間： 2011～2012  
課題番号： 23890092  
研究課題名（和文） 白血病の中樞神経を含んだ骨髄内外における白血病微小環境の解析に関する研究  
研究課題名（英文） Analysis of extramedullary microenvironment including central nerve system of leukemic cells  
研究代表者 加藤 格  
(Itaru Kato)  
京都大学・医学研究科・特定病院助教  
研究者番号： 10610454

## 研究成果の概要（和文）：

ヒト白血病患者の骨髄中に含まれる白血病細胞を移植し、髄外浸潤を伴ったヒト白血病マウスを作成した。ヒト白血病化 NOG マウスは中樞神経浸潤も病理レベルで再現していることが確認された。さらなる多角的な解析からもヒト白血病化 NOG マウスの中樞神経浸潤はヒト白血病中樞神経浸潤を忠実に再現していた。白血病マウスの中で中樞神経に浸潤した白血病細胞と骨髄で増殖する白血病細胞を採取し、複数症例においてそれぞれの遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析にて比較した結果、中樞神経白血病細胞で特に発現が高くなっている遺伝子群が存在した。さらには白血病細胞を NOG マウスに移植する再移植実験によって、中樞神経から採取した白血病細胞も骨髄由来白血病細胞と同等の白血病再構築能があることが示された。これらの結果から中樞神経に浸潤した白血病細胞は性質を変え、再発に寄与していることが示唆された。今回の解析結果は中樞神経白血病の病態を明らかにし、合併症の少ない中樞神経白血病の新治療開発へとつながる知見であると考えられる。

## 研究成果の概要（英文）：

Bone marrow samples from ALL patients were transplanted into NOG mouse and extramedullary organs including CNS showed the leukemic invasion. In the CNS, we observed the infiltration of leukemic cells that is consistent with pathology of human ALL patients. Several analyses suggest that our model recapitulates the CNS disease and histopathology of human ALL leukemic CNS. To identify genes involved in CNS leukemia development, we applied high-density oligonucleotide arrays to leukemic cells in CNS and BM. A series of CNS leukemic cell-specific gene sets have been successfully identified. Next, we transplanted leukemic cells harvested from CNS into NOG mice, and leukemic cells reconstitute the leukemia. Those results showed that leukemic cells in CNS contributed to the relapse of the disease with altering the gene expression pattern. This information could be utilized for further mechanistic research and for devising optimized therapeutic strategies against CNS leukemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 23 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 24 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：白血病・中枢神経再発・微小環境

1. 研究開始当初の背景

小児悪性腫瘍の最も多くを占める小児白血病は治癒率が画期的に改善されているが、依然として予後不良な病型が存在し、さらなる病態の解明、新規治療法の開発が待たれている。特に白血病中枢神経浸潤は現在でも予後不良群と考えられ、歴史的に放射線照射の追加や髄液化学療法を増量など治療強化が図られてきたが、小児期中枢神経治療は二次がんや神経毒性、内分泌異常や成長障害など長期的な合併症の危険があり、治癒しても生活の質を大きく損ねる合併症が残る、ということのないより白血病細胞特異的な治療が求められている。

近年、白血病と微小環境との関わりが注目されている。先行していた正常造血幹細胞微小環境の知見を基礎に、主として骨髄での微小環境に目が向けられ、免疫不全マウスを用いた系により幾つかの報告がなされてきた。一方で白血病再発において、臨床的には中枢神経再発や精巣再発などを中心とした治療の行きとどきにくい髄外微小環境における白血病幹細胞残存が大きく寄与している。治療抵抗性で中枢神経のみで再発する白血病も多く存在し、造血支持組織ではない中枢神経などでの白血病増殖には骨髄とはまったく異なるメカニズムが働いていると考えられる。しかしながら白血病における微小環境の研究は骨髄内における微小環境にほぼ限られており、こうした髄外の微小環境に注目

した研究は、国内外を通じてほとんどない。

2. 研究の目的

NOG in vivo ALL モデルを利用したシステムにより髄外浸潤や化学療法後の中枢神経再発など、髄外で白血病・白血病幹細胞が生存する微小環境の生物学的特性を明らかにし、更に微小環境における白血病幹細胞維持に深く関わる因子を標的とした新規の治療基盤技術開発を目指す。

3. 研究の方法

ヒト白血病患者の骨髄中に含まれる白血病細胞を移植し、髄外浸潤を伴ったヒト白血病マウスを作成する。ヒト白血病化した NOG マウスの中枢神経を経時的に病理組織にて評価し、ヒト白血病の中枢神経浸潤の経時的浸潤進展パターンの解析を行う。由来患者の異なる白血病細胞モデル間や各週臓器に浸潤した白血病細胞間の比較検討を行い、中枢神経浸潤白血病細胞に特徴的因子を同定する。

4. 研究成果

(1) ヒト白血病化 NOG マウスの中枢神経ではヒトにおいて白血病細胞が浸潤することが知られている Virchow-Robin space に白血病細胞が浸潤している病理像が得られ、ヒト白血病化 NOG マウスは中枢神経浸潤も病理レベルで再現していることが確認された。このヒト白血病化 NOG マウスを経時的に病理組織にて評価すると、ヒト白血病の中枢神経浸潤の

経時的浸潤進展パターンを確認することができた。この様な白血病細胞の中樞神経浸潤の経時的な病理組織評価は患者体内での検討は不可能であり、マウスモデルを用いて初めて可能になった。

(2) このヒト白血病化 NOG マウスの髄液を採取しサイトスピンや FACS にて解析するとヒト白血病細胞のみが髄液中に浸潤しており、さらにはヒト白血病化 NOG マウスの造影頭部 MRI にて硬膜下に強い集積を認める画像が得られた。この様な多角的な解析からもヒト白血病化 NOG マウスの中樞神経浸潤はヒト白血病中樞神経浸潤を忠実に再現していることが確認された。今回我々が樹立した中樞神経浸潤を伴うヒト白血病化 NOG マウスはヒト白血病の中樞神経浸潤を解析するにあたって非常に有用な系だと考えられた。

(3) 中樞神経浸潤した白血病細胞の採取方法について検討したが、Dissociator などの分離機材を使用するよりも用手的に剪刀を用いて機械的に分離する方法が最も効率よく白血病細胞を採取できることが判明した。

(4) この方法を用いて白血病マウスの中で中樞神経に浸潤した白血病細胞と骨髄で増殖する白血病細胞を採取し、複数症例においてそれぞれの遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析にて比較した。その結果、中樞神経白血病細胞で特に発現が高くなっている遺伝子群が存在することが判った。さらに統計学的解析により、この中樞神経白血病で発現が高くなっている遺伝子群の中には正常神経細胞で特異的に発現している遺伝子が有意に濃縮されていたことが分かった。

(5) 採取した白血病細胞を NOG マウスに移植する再移植実験によって、中樞神経から採取した白血病細胞も骨髄由来白血病細胞と同等の白血病再構築能があることが示された。

この結果から中樞神経に浸潤した白血病細胞は性質を変え、再発に寄与していることが強く示唆された。今回の解析結果は中樞神経白血病の病態を明らかにし、合併症の少ない中樞神経白血病の新治療開発へとつながる知見であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Kato I, Niwa A, Heike T, et al. Identification of Hepatic Niche Harboring Human Acute Lymphoblastic Leukemic Cells via the SDF-1/CXCR4 Axis. **PLoS One** 2011;6:e27042. 10.1371/journal.pone.0027042
2. Saida S, Watanabe KI, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, et al. Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. **Blood**. 2013 Mar 12. 10.1182/blood-201212-474387

[学会発表] (計 4 件)

1. Kato I, et al. Analysis of extramedullary microenvironment of leukemic cells through NOD/SCID/ $\gamma$ c Null Mouse Xenograft Model transplanted with Patient-Derived Acute Lymphoblastic Leukemic Cells; 1st Samsung Humanized Mice Symposium. Samsung Seoul Hospital, Seoul, Korea April 14, 2012
2. Kato I, et al. Leukemic cells in the extramedullary site contribute to the relapse of the disease. 11th Interim Meeting of the I-BFM Resistant Disease

Committee, Rome, 10<sup>th</sup> Feb. 2012

3. Kato I, et al. Analysis of extramedullary microenvironment of leukemic cells through NOD/SCID/ $\gamma$ c Null Mouse Xenograft Model transplanted with Patient-Derived Acute Lymphoblastic Leukemic Cells. 3<sup>rd</sup> International workshop on Humanized Mice. 28<sup>th</sup> Oct. 2011
4. Analysis of CNS Leukemic Microenvironments through Xenograft Model In NOG Mouse. 第73回 日本血液学会学術集会 名古屋 2011年10月14日

[その他]

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~pediatrics/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 格 (Kato Itaru)

京都大学 医学研究科

特定病院助教

研究者番号：10610454